

S. Nitcheman¹P. Jacquet¹

Utilisation de souriceaux pour la mise en évidence de l'infectivité des glossines

NITCHEMAN (S.), JACQUET (P.). Utilisation de souriceaux pour la mise en évidence de l'infectivité des glossines. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (2) : 219-223.

Pour identifier les glossines infectantes porteuses de trypanosomes métacycliques, des glossines présumées infectées sont individuellement nourries trois fois de suite sur des souriceaux (une mouche par souriceau) dont le contrôle parasitologique permet de détecter les mouches capables de transmettre le parasite. Cette technique qu'on pourrait désigner par le terme de « xénodiagnostic inverse » se révèle bonne, facile à mettre en oeuvre pour la constitution rapide de lots de glossines infectantes utilisés ensuite comme matériel d'étude. En revanche, elle ne peut s'appliquer qu'aux espèces ou souches de trypanosomes auxquelles la souris est sensible. Les résultats confirment le maintien, durant toute sa vie, du potentiel vecteur de la glossine. *Mots clés* : *Glossina* - *Trypanosoma* - Pouvoir infectant - Diagnostic.

INTRODUCTION

Dans une étude comparative de la sensibilité de glossines infectées et non infectées par les trypanosomes à des pyrèthrinoides de synthèse (11, 12), la méthode de salivation sur lame a été utilisée pour identifier les glossines réellement infectées (1, 2, 4, 9). Cependant, cette méthode n'a pas permis d'obtenir rapidement un nombre suffisant de glossines infectées. Il a donc fallu rechercher un procédé plus efficace. Parmi les méthodes de détection qui conservent la mouche vivante, salivation sur lame ou infection d'animaux de laboratoire, seule cette dernière permet la mise en évidence de l'infectivité.

En effet, il arrive que certaines mouches décelées infectées par la salivation sur lame ne soient pas infectantes (4), d'où l'intérêt de l'utilisation d'animaux de laboratoire pour une détection certaine. Toutefois, cette technique ne s'applique qu'aux espèces ou souches de trypanosomes auxquelles la souris est sensible : *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei*, *T. (T.) brucei rhodesiense*, de nombreuses souches de *T. (Nannomonas) congolense*, certaines souches de *T. (Duttonella) vivax* (6, 8, 16).

1. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT), 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

Reçu le 12.12.89, accepté le 02.01.90.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Principe de la méthode

Il consiste à faire piquer individuellement des souriceaux par des glossines présumées infectées par les trypanosomes et à identifier, après examen microscopique du sang des souriceaux, celles chez lesquelles le cycle du parasite est à son terme, c'est-à-dire celles devenues infectantes.

Par analogie avec la technique du xénodiagnostic (3), cette méthode pourrait être désignée par le terme de « xénodiagnostic inverse ». Elle a été expérimentée avec *Glossina morsitans morsitans* et *G. austeni* infectées par *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*.

Matériel

Glossines

Les glossines proviennent du laboratoire de l'IEMVT à Maisons-Alfort :

— *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850, souche du Zimbabwe, élevée au laboratoire depuis 1965 ;

— *Glossina austeni* Newstead, 1912, souche Langford d'Angleterre, élevée depuis 1966.

Seules des glossines femelles ont été utilisées dans ce travail.

Trypanosomes

Trypanosoma (Nannomonas) congolense Broden, 1904, souche EATRO 325 d'origine ougandaise, infectieuse pour la souris (13) et conservée en azote liquide à - 196 °C depuis 1971.

Lapins nourriciers

Des lapins de race Bouscat servent à l'alimentation régulière des mouches de l'élevage. Les mouches sont infectées par l'intermédiaire de lapins parasités.

Souriceaux

Un élevage de souris de souches NMRI (Naval Medical Research Institute) ou Balb C (lignée non consanguine « Bagg Albino ») est indispensable pour la production régulière et suffisante de souriceaux. Pour des raisons de disponibilité, des souris de souche NMRI ont été utilisées.

Les souriceaux sont âgés d'une semaine à 10 jours, âge auquel la pilosité dorsale apparaît et permet d'inscrire un numéro d'ordre à l'acide picrique, seul marqueur indélébile parmi ceux essayés.

Tubes en plastique

Pour l'isolement des glossines, on emploie des tubes en plastique d'environ 7 cm de long et 3 cm de diamètre. Chaque tube, dont l'ouverture est obturée par un morceau de tulle, ne contient qu'une seule mouche.

Application de la méthode

Facile à utiliser, elle a permis de déceler rapidement un nombre suffisant de mouches infectantes par le contrôle des souriceaux.

Les glossines sont nourries régulièrement dès leur émergence sur lapins parasités pendant trois semaines, puis sont laissées à jeun deux jours pour stimuler leur appétit ; elles sont alors individuellement transférées dans les tubes plastiques.

Chaque mouche est invitée à piquer 2, 3 ou 4 fois de suite le même souriceau à 48 h ou 72 h d'intervalle et est maintenue dans son tube jusqu'à l'examen du sang des souriceaux.

Le contrôle des souriceaux est généralement effectué 48 à 72 h après le dernier repas des mouches, par l'examen d'une goutte de sang au microscope à contraste de phase (grossissement x 400).

RÉSULTATS

La présence de trypanosomes dans le sang du souriceau détermine le caractère infectant de la mouche qui lui correspond.

A l'inverse, lorsque aucun trypanosome n'est observé, la mouche est considérée comme non infectante au moment des tests.

Les résultats des observations sont présentés sous forme de tableaux exprimant les pourcentages des

mouches décelées infectantes, en relation avec les intervalles de temps entre le premier repas sur souriceaux et les contrôles (délais en jours), le nombre de repas effectués dans l'intervalle (Tabl. I), le nombre de contrôles (Tabl. II) et l'âge des mouches (Tabl. III).

Comme l'indique le tableau I, le nombre de repas varie de 2 à 4. Pour un même nombre de repas, les différences de pourcentage ne sont pas significatives.

TABEAU I Pourcentages de *G. morsitans* femelles infectantes à *T. congolense* en relation avec le nombre de repas et l'intervalle entre le premier repas et les contrôles.

Délai (jours)	Nombre de repas	Nombre de glossines	Glossines infectantes (p. 100)	χ^2 entre I_5 et chacun des autres délais	χ^2 entre les différents groupes de repas (2 et 3 ; 3 et 4)
5	2	36	22,2	2,440 NS	7,026**
6	3	19	42,1		
7	3	371	46,6	7,898**	
8	3	775	43,5	6,338*	
9	3	344	44,8	6,690**	3,201 NS
11	4	337	48,7	9,151**	
12	4	52	50	6,902**	
13	4	21	61,9	9,109**	

TABEAU II Résultats comparatifs de deux contrôles successifs de souriceaux ayant nourri trois fois des femelles de *G. m. morsitans* présumées infectées par *T. congolense*.

Lot	Nombre de glossines	Délai (jours)	Glossines infectantes (p. 100)
1	38	6 1 ^{er} contrôle	7 (18,4)
		8 2 ^e contrôle	12 (31,6)
2	38	8 1 ^{er} contrôle	15 (39,5)
		10 2 ^e contrôle	17 (44,7)
3	13	9 1 ^{er} contrôle	4 (30,8)
		11 2 ^e contrôle	6 (46,2)

TABLEAU III Pouvoir infectieux à 86 jours d'âge de *G. austeni* femelles décelées infectantes à *T. congolense* et non infectantes à 30 jours d'âge.

	Effectif	Glossines infectantes	Glossines non infectantes
Glossines infectantes à J30 et survivantes à J86	28	27	1
Glossines non infectantes à J30 et survivantes à J86	30	14	16

Pour des nombres de repas différents, on constate :

- une différence significative entre 2 et 3 repas et entre 2 et 4 repas ;
- une différence non significative entre 3 et 4 repas.

Le pourcentage des glossines infectantes pour les intervalles supérieurs à 6 jours est significativement plus élevé que celui obtenu pour un intervalle de 5 jours.

En revanche, l'analyse statistique ne révèle pas de différences significatives entre les pourcentages de glossines infectantes au-delà de l'intervalle de 6 jours. On peut en conclure que trois repas dans un intervalle d'une semaine apparaissent suffisants.

A l'intérieur de chaque lot, on observe un accroissement des pourcentages des glossines infectantes entre le premier et le deuxième contrôle parasitologique des souriceaux. Cependant, aucune conclusion ne peut être tirée de l'analyse statistique en raison des effectifs très faibles.

Cent trente-neuf *Glossina austeni* femelles, âgées de 30 jours et présumées infectées, ont été soumises à trois repas sur souriceaux à 48 h d'intervalle. Les contrôles effectués 7 jours après le premier de ces repas ont mis en évidence 46 p. 100 de glossines infectantes et 54 p. 100 de non infectantes.

Chacun de ces groupes a été conservé et nourri régulièrement sur lapins indemnes de trypanosomes jusqu'à leur 86e jour. Les mouches survivantes décelées infectantes et non infectantes lors du premier test ont alors été à nouveau éprouvées sur souriceaux dans les mêmes conditions que lors du premier contrôle (Tabl. III).

Vingt-sept des 28 mouches infectantes à J30 le sont encore à J86. L'unique mouche n'ayant pu infecter son souriceau a été disséquée : l'intestin moyen, le labre et l'hypopharynx étaient envahis de trypanosomes.

Ce cas indique qu'une glossine antérieurement infectante peut se révéler non infectante (vis-à-vis du souriceau) même après trois repas, bien que l'hypopharynx ait présenté des métatrypanosomes.

A 86 jours, 14 des 30 glossines non infectantes à 30 jours ont réussi à transmettre le parasite à leur souriceau. Une deuxième épreuve de contrôle s'avère donc nécessaire après un premier test négatif.

DISCUSSION

Il est nécessaire de disposer d'un élevage plus ou moins important pour la production régulière des souriceaux. Comme les souris sont très prolifiques, les moyens requis ne sont pas considérables.

Les seuls inconvénients résident dans le nombre de repas individuels sur souriceau (au moins 3) et dans la longueur de la période pendant laquelle le sang des souriceaux est encore négatif à l'examen microscopique.

La technique ne s'applique qu'aux espèces ou souches de trypanosomes infectieuses pour la souris ou adaptées aux rongeurs, comme cela a déjà été signalé.

La méthode de salivation (1, 2), améliorée par BURTT (4), qui utilise des lames recouvertes d'une mince pellicule d'albumen d'oeuf et des cobayes comme leurre, a l'avantage de s'appliquer à toutes les espèces de trypanosomes. Elle a aussi été utilisée pour la collecte et l'étude de la composition chimique de la salive chez les glossines (5, 14).

YOUDEOWEI (15) estime qu'« en pratique, la méthode de BURTT est difficile, fastidieuse et consomme beaucoup de temps ». Il propose l'utilisation de patagium de chauve-souris à travers lequel il fait piquer les mouches dont la salive est recueillie sur une surface délimitée d'une lame porte-objet. Mais le patagium de chauve-souris est encore plus difficile à se procurer.

La technique de salivation sur lame chauffée à 37-38 °C (9) est largement utilisée pour séparer les glossines infectées des autres. Cependant, sa mise en oeuvre n'est pas aussi simple qu'il y paraît ; ses contraintes sont assez nombreuses :

- certaines mouches refusent de sonder la lame même chauffée ; il faut noter qu'une mouche est plus disposée à piquer un souriceau qu'une lame ;
- une mouche infectée ou infectante ne dégorge pas systématiquement des trypanosomes lors d'un sondage, et même si elle en dégorge une faible quantité, l'examen de la lame après coloration peut se révéler négatif ;

S. Nitcheman, P. Jacquet

— la fixation et la coloration de la préparation se révèlent presque toujours assez délicates ;

— les mouches infectées détectées par la salivation ne sont pas nécessairement infectantes.

BURTT (4) a utilisé, parallèlement à la salivation, des rats blancs sains sur lesquels les glossines ont été individuellement nourries et a comparé les deux méthodes. Il en conclut que celle sur rats est un peu plus efficace que celle sur lame ; néanmoins, il préconise la méthode de salivation.

Ici, l'avantage de la méthode des souriceaux est qu'ils sont plus faciles à manipuler que des rats ; de surcroît, l'immaturité de leur système immunitaire n'empêche pas l'apparition précoce et même massive de la parasitémie. Pour un usage pratique, la prise de trois repas dans un intervalle d'une semaine permet la sélection, dans un lot de glossines, d'un pourcentage suffisant d'individus infectants.

En raison de la durée variable du cycle de développement de *T. congolense* chez son vecteur, de 7 à 53 jours (7, 10), la répétition du test sur les mouches non infectantes se révèle nécessaire afin de déceler le plus possible les faux négatifs lors du premier contrôle.

Les résultats du tableau III suggèrent la pérennité du caractère infectant chez la glossine jusqu'à l'âge de

trois mois, espérance de vie de ce vecteur dans les conditions naturelles.

CONCLUSION

L'emploi du « xénodiagnostic inverse » doit être réservé aux glossines d'un certain âge et sa répétition s'avère parfois indispensable pour récupérer des insectes tardivement infectants. Néanmoins, c'est une technique fiable et intéressante pour déceler des glossines infectantes au laboratoire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement les Drs CHALLIER, CLAIR, COZ, GRUVEL, ITARD, MOREL et UILENBERG pour leurs critiques constructives et leurs très judicieux conseils.

NITCHEMAN (S.), JACQUIET (P.). Use of suckling mice for the detection of tsetse flies with mature trypanosome infections. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43** (2) : 219-223.

To detect infective tsetse flies hosts of metacyclic trypanosomes, flies presumably infected with trypanosomes were individually fed on suckling mice three times consecutively (one fly per mouse). The blood of the mice was microscopically examined later in order to detect corresponding infective flies. This « inverse xenodiagnosis » is suitable and easy for the rapid detection of infective flies and for the constitution of glossine stocks for experimental purposes. In contrast it can only be used for species or strains of trypanosomes that are infective to mice. The results also emphasize that an infective fly remains dangerous throughout its life as it transmits the parasite continuously. *Key words* : Glossina - Trypanosoma - Infectivity - Diagnosis.

NITCHEMAN (S.), JACQUIET (P.). El uso de ratones jóvenes para demostrar la infección tripanosómica de glosinas. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43** (2) : 219-223.

Con el fin de identificar las glosinas infectantes portadoras de tripanosomas metacíclicos, glosinas aparentemente infectadas fueron alimentadas con ratones jóvenes (una mosca por animal), cuyo control parasitológico permitió la detección de las moscas capaces de transmitir el parásito. Esta técnica, que podríamos llamar « xenodiagnóstico inverso », se mostró eficiente, fácil de maniobrar para la constitución rápida de lotes de glosinas infectantes, utilizadas luego como material de estudio. Sin embargo, sólo puede ser aplicada con las especies o líneas de tripanosomas a las cuales son sensibles los ratones. Los resultados confirman el mantenimiento perenne del potencial de la glosina como vector. *Palabras claves* : Glosina - Tripanosoma - Poder infectante - Diagnóstico.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRUCE (D.) *et al.* Rep. sleep. Sickn. Commn R. Soc., 1914, **15** : 137, 138, 141.
2. BRUCE (D.) *et al.* Development in *Glossina morsitans* of the trypanosome - *Trypanosoma brucei* vel *rhodesiense* causing disease in man. The Zululand strain. Strain XXV. Rep. sleep. Sickn. Commn R. Soc., 1915, **16** : 144-150.
3. BRUMPT (E.). Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la tripanosomose de Chagas. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1914, **7** : 706-710.

4. BURTT (E.). Salivation by *Glossina morsitans* on to glass slides : a technique for isolating infected flies. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1946, **40** : 141-144.
5. FAIRBAIRN (H.), WILLIAMSON (J.). The composition of tsetse-fly saliva. I. A histochemical analysis. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1956, **50** : 322-333.
6. GATHUO (H.K.W.), NANTULYA (W.M.), GARDINER (P.R.). *Trypanosoma vivax* : adaptation to two East African stocks to laboratory rodents. *J. Protozool.*, 1987, **34** : 48-53.
7. ITARD (J.). Les trypanosomoses animales africaines. In : TRONCY (P.M.), ITARD (J.), MOREL (P.C.). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Paris, Ministère de la Coopération et du Développement, 1981. P. 303-469. (Manuels et Précis d'élevage n° 10).
8. LEEFLANG (P.), BUYS (J.), BLOTKAMP (C.). Studies on *Trypanosoma vivax* : infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *Int. J. Parasit.*, 1976, **6** : 413-417.
9. MULLIGAN (H.W.). The African trypanosomiasis. London, George Allen and Unwin., 1970. P. 87-88.
10. NANTULYA (V.M.), DOYLE (J.J.), JENNI (L.). Studies on *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*. II. Observations on the cyclical transmission of three field isolates by *Glossina morsitans morsitans*. *Acta trop.*, 1978, **35** : 339-344.
11. NITCHEMAN (S.). Comparaison des longévités des glossines (*Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850) infectées par les trypanosomes (*Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Broden, 1904) et des glossines saines. *Annls Parasit. hum. comp.*, 1988, **63** (2) : 163-164.
12. NITCHEMAN (S.), CHALLIER (A.), CARLE (P.R.), CLAIR (M.). Effets des doses sublétales de deltaméthrine sur le couple *Glossina morsitans morsitans*-*Trypanosoma (Nannomonas) congolense*. C.r. Acad. Sci. Paris, sér. III, 1988, **307** : 423-426.
13. UILENBERG (G.), GIRET (M.). Études immunologiques sur les trypanosomoses. I. Existence d'un type antigénique de base chez une souche de *Trypanosoma congolense* Broden, 1904. Variations après transmission cyclique. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1972, **25** (1) : 37-52.
14. WILLIAMSON (J.). The composition of tsetse-fly saliva. II. Analysis of amino acids and sugars by paper partition chromatography. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1956, **50** : 334-344.
15. YOUDEOWEI (A.). A simple technique for observing and collecting the saliva of tsetse flies (*Diptera, Glossinidae*). *Bull. ent. Res.*, 1975, **65** : 65-67.
16. ZWART (D.). A review of studies on three mouse-infective *T. vivax* strains. *Vet. Sci. Commun.*, 1979, **3** : 187-206.